

English Abstract for Japanese Patent Publication No. 64-002576:

S5 1 PN="JP 64002576"

?t s5/9/1

5/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007705883

WPI Acc No: 1988-339815/198848

XRAM Acc No: C88-150161

Non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein - obtd. by recombinant DNA techniques from liver infected with non-A non-B hepatitis

Patent Assignee: MITSUBISHI CHEM IND LTD (MITU)

Inventor: KAMIZONO M; KITAMURA N; MATSUI R; NAKAANISHI S; TERANISHI Y

Number of Countries: 004 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 293274	A	19881130	EP 88400790	A	19880331	198848 B
JP 64002576	A	19890106	JP 87140586	A	19870604	198907
JP 1124387	A	19890517	JP 87283990	A	19871110	198926
CN 1031717	A	19890315				199010
US 5032511	A	19910716	US 88168357	A	19880315	199131
EP 293274	B	19910904				199136
DE 3864585	G	19911010				199142
JP 2590885	B2	19970312	JP 87140586	A	19870604	199715

Priority Applications (No Type Date): JP 87283990 A 19871110; JP 8778313 A 19870331; JP 87140586 A 19870604

Cited Patents: 5.Jnl.Ref; EP 190972; EP 66296; EP 92249

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 293274	A	E	33		
-----------	---	---	----	--	--

JP 2590885	B2	13	C12N-015/09	Previous Publ. patent JP 64002576	
------------	----	----	-------------	-----------------------------------	--

Abstract (Basic): EP 293274 A

A DNA fragment is claimed which contains a base sequence coding for a non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein occurring in cells of the liver affected with non-A non-B hepatitis. Also claimed is an expression vector in which a DNA fragment contg. a base sequence coding for non-A non-B hepatitis-specific antigen is introduced into a cloning site present downstream from a promoter and transformants obtd. using the vector.

USE/ADVANTAGE - The antigenic protein can be produced with low cost on a large scale. The protein can be used for the in vitro diagnosis of non-A non-B hepatitis. The DNA can also be used as a probe in hybridisation assays for detecting in vitro an infection by non-A non-B hepatitis virus.

0/7

Abstract (Equivalent): EP 293274 B

A DNA fragment which contains a base sequence coding for an antigenic protein specifically occurring in a host affected with non-A non-B hepatitis, said protein comprising the whole or a part of a sequence of 444 aminoacids given in the specification. (45pp)

Abstract (Equivalent): US 5032511 A

DNA fragment that encodes the prodn. of a non-A non-B hepatitis-specific antigenic protein which occurs in liver cells infected with non-A non-B hepatitis, has been isolated. The aminoacid sequence of this antigenic protein has been determined. Expression vectors contg. this DNA fragment at a cloning site downstream from a promoter have been used to transform host cells to produce the antigenic protein. USE - The antigenic protein is a reagent for the rapid diagnosis of non-A non-B hepatitis and for the prodn. of vaccines.

(26pp)

Title Terms: NON; NON; HEPATO; SPECIFIC; ANTIGEN; PROTEIN; OBTAIN;
RECOMBINATION; DNA; TECHNIQUE; LIVER; INFECT; NON; NON; HEPATO
Index Terms/Additional Words: DEOXYRIBONUCLEIC; ACID

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): A61K-039/29; C07H-015/12;
C07K-003/00; C12N-001/20; C12N-005/00; C12N-007/00; C12N-015/00;
C12P-019/34; C12P-021/02; C12R-001/19; C12N-015/09; C12R-001-91

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B02-V02; B04-B02B; B04-B04A; B12-A01; B12-G02;
B12-K04A4; D05-H03B; D05-H04; D05-H06; D05-H07; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M421 M423 M720 M903 N135 Q233 V273 V752 V791

02 M423 M710 M903 Q233 V753

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-2576

⑪ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)1月6日

C 12 N 15/00
//C 12 N 15/00
C 12 R 1:91)

8412-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全13頁)

⑭ 発明の名称 DNA断片

⑮ 特 願 昭62-140586

⑯ 出 願 昭62(1987)6月4日

優先権主張 ⑰ 昭62(1987)3月31日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭62-78313

⑳ 発 明 者 高 橋 和 展 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
会社総合研究所内㉑ 発 明 者 渋谷 達 郎 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
会社総合研究所内㉒ 発 明 者 内 田 み ち る 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
会社総合研究所内

㉓ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉔ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称 DNA断片

2 特許請求の範囲

- (1) 非A非B型肝炎発症時の肝細胞内に出現する非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする塩基配列を含んで成るDNA断片。
- (2) 肝細胞が、ヒト又はチンパンジーの肝細胞であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のDNA断片。
- (3) 非A非B型肝炎特異抗原蛋白質が、下記のアミノ酸配列の全部又は一部で示されることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のDNA断片。

Met Ala Val Thr Thr Arg Leu Thr Trp 10
His Glu Lys Ile Leu Gln Asn His Phe Gly 20
Gly Lys Arg Leu Ser Leu Leu Tyr Lys Gly 30
Ser Val His Gly Phe His Asn Gly Val Leu 40
Leu Asp Arg Cys Cys Asn Gln Gly Pro Thr 50
Leu Thr Val Ile Tyr Ser Glu Asp His Ile 60

Ile Gly Ala Tyr Ala Glu Glu Gly Tyr Gln 70
Glu Arg Lys Tyr Ala Ser Ile Ile Leu Phe 80
Ala Leu Gln Glu Thr Lys Ile Ser Glu Trp 90
Lys Leu Gly Leu Tyr Thr Pro Glu Thr Leu 100
Phe Cys Cys Asp Val Ala Lys Tyr Asn Ser 110
Pro Thr Asn Phe Gln Ile Asp Gly Arg Asn 120
Arg Lys Val Ile Met Asp Leu Lys Thr Met 130
Glu Asn Leu Gly Leu Ala Gln Asn Cys Thr 140
Ile Ser Ile Gln Asp Tyr Glu Val Phe Arg 150
Cys Glu Asp Ser Leu Asp Glu Arg Lys Ile 160
Lys Gly Val Ile Glu Leu Arg Lys Ser Leu 170
Leu Ser Ala Leu Arg Thr Tyr Glu Pro Tyr 180
Gly Ser Leu Val Gln Gln Ile Arg Ile Leu 190
Leu Leu Gly Pro Ile Gly Ala Gly Lys Ser 200
Ser Phe Phe Asn Ser Val Arg Ser Val Phe 210
Gln Gly His Val Thr His Gln Ala Leu Val 220
Gly Thr Asn Thr Thr Gly Ile Ser Glu Lys 230
Tyr Arg Thr Tyr Ser Ile Arg Asp Gly Lys 240
Asp Gly Lys Tyr Leu Pro Phe Ile Leu Cys 250

特開昭64-2576(2)

Asp Ser Leu Gly Leu Ser Glu Lys Glu 340
 Gly Leu Cys Met Asp Asp Ile Ser Tyr 370
 Leu Asn Gly Asn Ile Arg Asp Arg Tyr 380
 Phe Asn Pro Met Glu Ser Ile Lys Leu Asn 390
 His His Asp Tyr Ile Asp Ser Pro Ser 300
 Lys Asp Arg Ile His Cys Val Ala Phe Val 310
 Phe Asp Ala Ser Ser Ile Glu Tyr Phe 320
 Ser Gln Met Ile Val Lys Ile Lys Arg 330
 Arg Arg Glu Leu Val Asn Ala Gly Val 340
 His Val Ala Leu Leu Thr His Val Asp 350
 Met Asp Leu Ile Thr Lys Gly Asp Leu 360
 Glu Ile Glu Arg Cys Val Pro Val Arg 370
 Lys Leu Glu Glu Val Gln Arg Lys Leu 380
 Phe Ala Leu Ser Asp Ile Ser Val Val 390
 Asn Tyr Ser Ser Glu Trp Glu Leu Asp 400
 Val Lys Asp Val Leu Ile Leu Ser Ala 410
 Arg Arg Met Leu Trp Ala Ala Asp Asp 420
 Leu Glu Asp Leu Pro Phe Glu Gln Ile 430
 Asn Leu Arg Glu Glu Ile Ile Asn Cys 440

GAA AGA AAG 320 TAT GGT TCG 330 ATC ATC GTT 340 TTT
 GGA GTT CAA 350 GAG AAT AAA 360 ATT TCA GAA 370 TGG
 AAA GTA GGA 380 GTA TAT AOA 390 GGA GAA 400 ACA GTG
 TTT TGT TGT 310 GAC GTT GGA 320 AAA TAT AAO 330 TCG
 GGA AOT AAT 340 TCG GAG ATA 350 GAT GGA 360 AGA AAT
 AGA AAA GTG 370 ATT ATG GAG 380 TTA AAG AOA 390 ATG
 GAA AAT GTT 400 GGA GTT GGT 410 CAA AAT TGT 420 ACT
 ATG TGT ATT 430 GAG GAT TAT 440 GAA GTT TTT 450 GGA
 TGG GAA GAT 460 TGA GTG GAG 470 GAA AGA AAG 480 ATA
 AAA GGG GTG 490 ATT GAG GTG 500 AGG AAG AGG 510 TTA

Gln Gly Lys Lys ...

(4) 核酸配列が、下記の塩基配列の全部又は一部で示されることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のDNA断片。

5' ATG GGA GTG 10 AGA ACT GGT 20 TTG AOA TGG 30 TTT
 GAT GAA AAG 40 ATG GTG GAA 50 AAT CAT TTT 60 GGA
 GGG AAG GGG 70 CTT AGG GTT 80 GTC TAT AAG 90 GGT
 AGT GTG GAT 100 GGA TTC CAT 110 AAT GGA GTT 120 TTT
 CTT GAG AGA 130 TGT TGT AAT 140 GAA GGG GGT 150 AAT
 GTA AOA GTG 160 ATT TAT AGT 170 GAA GAT CAT 180 ATT
 ATT GGA GGA 190 TAT GGA GAA 200 GAG GGT TAC 210 CAG

GTG TGT GCC 220 TTG AGA ACT 230 TAT GAA COA 240 TAT
 GGA TGG GTG 250 GTT GAA CAA 260 ATA GGA ATT 270 GTG
 GTG CTG GGT 280 GGA ATT GGA 290 GGT GGG AAG 300 TGT
 AGG TTT TTT 310 AAG TCA GTG 320 AAG TGT GTT 330 TTT
 CAA GGG CAT 340 GTA AAG GAT 350 CAG GGT TTG 360 GTG
 GGG AOT AAT 370 AOA AOT GGG 380 ATA TGT GAG 390 AAG
 TAT AAG AOA 400 TAC TGT ATT 410 AGA GAG GGG 420 AAA
 GAT GGG AAA 430 TAC GTG COA 440 TTT ATT GTG 450 TGT
 GAG TCA GTG 460 GGG GTG AAT 470 GAG AAA GAA 480 GGG
 GGG GTG TGG 490 ATG GAT GAC 500 ATA TGG TAC 510 ATG

TTG AAG GGT⁸²⁰ AAG ATT GGT⁸³⁰ GAT AGA TAO⁸⁴⁰ CAG

TTT AAT GGT⁸⁵⁰ ATO GAA TCA⁸⁶⁰ ATO AAA TTA⁸⁷⁰ AAT

OAT OAT GAG⁸⁸⁰ TAO ATT GAT⁸⁹⁰ TCO CCA TOG⁹⁰⁰ OTG

AAO GAG AGA⁹¹⁰ ATT OAT TGT⁹²⁰ OTG GCA TTT⁹³⁰ GTA

TTT GAT GGC⁹⁴⁰ AGG TOT ATT⁹⁵⁰ GAA TAO TTO⁹⁶⁰ TCC

TOT CAG ATO⁹⁷⁰ ATA GTA AAO⁹⁸⁰ ATO AAA AGA⁹⁹⁰ ATT

GGA AGG GAG¹⁰⁰⁰ TTG GTA AAO¹⁰¹⁰ GGT GGT¹⁰²⁰ GTA

OAT OTG GCT¹⁰³⁰ TTG CTC ACT¹⁰⁴⁰ OAT OTG GAT¹⁰⁵⁰ AAG

ATG OAT GTG¹⁰⁶⁰ ATT ACA AAA¹⁰⁷⁰ GGT GAG OTT¹⁰⁸⁰ ATA

GAA ATA GAG¹⁰⁹⁰ AOA TGT GTG¹¹⁰⁰ GGT GTG¹¹¹⁰ AGG TCG

AAO OTA GAG¹¹²⁰ GAA GTO CAA¹¹³⁰ AGA AAA OTT¹¹⁴⁰ GGA

TTT GCT GTT¹¹⁵⁰ TOT GAG ATO¹¹⁶⁰ TOG GTO GTT¹¹⁷⁰ AAG

AAT TAT TCO¹¹⁸⁰ TOT GAG TGG¹¹⁹⁰ GAG CTG GAG¹²⁰⁰ COT

GTA AAO GAT¹²¹⁰ GTT OTA ATT¹²²⁰ CTT TOT GCT¹²³⁰ OTG

AGA CGA ATO¹²⁴⁰ OTA TGG GCT¹²⁵⁰ GGA GAT GAG¹²⁶⁰ TTO

TTA GAG GAT¹²⁷⁰ TTG COT TTT¹²⁸⁰ GAG CAA ATA¹²⁹⁰ GGG

AAT OTA AGG¹³⁰⁰ GAG GAA ATT¹³¹⁰ ATO AAO TGT¹³²⁰ GGA

GAA GGA AAA¹³³⁰ AAA 3'

(式中、「-」はその上に示された塩基に相補的な塩基を表わす)

2 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規なDNA断片に関する。

詳しくは、非A非B型肝炎発症時に特異的にみられる非A非B型肝炎特異抗原蛋白質の遺伝子(c-DNA)を含有するDNA断片に関する。

(従来の技術)

ウイルス性肝炎のうち、A型及びB型についてはそのウイルスが見出され、免疫学的な方法による診断も可能となっている。

しかしながら、A型でもB型でもなく、所謂、非A非B型といわれる肝炎は、輸血後肝炎の90%以上を占めるとされている[日本臨牀、J5:2724、1977、J. Biol. Med. (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・メディシン) 49:243、1976]が、未だ原因ウイルスが同定されてみらず、ヒトの非A非B型肝炎がチンパンジーへの感染可能であることが確認されているにすぎない[Lancet] (ランセッ

ト) : 459、1978、同 : 463、1978]。

非A非B型肝炎に関連した抗原抗体系の検索は、多くの研究者によって患者の血清を中心になされているが、まだ明確な系は見出されていない。そのため、非A非B型肝炎の診断は、A型肝炎及びB型肝炎、更には、肝障害をひきおこすことが知られている既知ウイルス、例えば、OMV、HBV、BBV等による肝炎か否かの診断を行ない、それらの肝炎でない場合に非A非B型肝炎と診断する、所謂、除外診断法によるため、手間がかかるのが現状である。

本発明者らの一部は、非A非B型肝炎を直接診断に有用な非A非B型抗原蛋白質をヒト及びチンパンジーの肝細胞から精製し、更に、その治療に有用なモノクローナル抗体を作成し、先に提案した(特開昭61-176856号、同61-56196号)。

(発明の解決すべき問題点)

しかしながら、例えば、診断試薬として使用

特開昭64-2576(4)

する場合に、多量の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質を必要とするが、多量の抗原蛋白質を非A非B型肝炎発症時のチンパンジー等の肝細胞から精製することは必ずしも好適な方法とはいえない。また核酸のハイブリダイゼーションによる非A非B型肝炎特異抗原遺伝子の検出、さらには、組換えDNA技術による非A非B型肝炎特異抗原の生産には、非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子断片の収得が必須である。

(問題点を解決するための手段)

そこで本発明者は、該抗原蛋白質を組換えDNA技術により大量に生産すべく鋭意検討を重ね、かかる目的に有用な非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子を初めて分離収得するに至り、本発明を完成した。

即ち、本発明の要旨は、非A非B型肝炎発症時の肝細胞内に出現する非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする核酸配列を含んで成るDNA断片に存する。

以下、本発明を説明するに、本発明の非A非B型肝炎特異抗原蛋白質(以下「本発明の抗原」という。)の遺伝子は、例えば、次のような方法によって得られる。

まず、ヒト又はチンパンジーの非A非B型肝炎発症個体(本発明においては、近年命名された所謂D型肝炎発症個体を含む。)の肝組織をグアニジウムチオシアネート水溶液等中でホモジナイズし、Chirgwinらの方法[Biochemistry(バイオケミストリー)18, 5294-5299, 1979]に従って、塩化セシウム平衡密度勾配超遠心法によって全RNAを沈澱として分離する。分離後、フェノール抽出、エタノール沈澱により全RNAを精製する。

抗原遺伝子のmRNAはpoly A部分を含むことが一般的であることから常法によりこれをオリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーにかけ精製し、ポリ(A)含有RNA(poly A+RNA)を単離しmRNA原料とする。このmRNA原料によりランダムプライマー法[Yousuke

かかるλgt11ファージ内に組み込まれたcDNAはλgt11ファージ上のβ-gal遺伝子の中に組み込まれるので該ファージの大腸菌への感染後IPTG(インプロビルβ-Dガラクトシド)等の物質添加による該ファージ上のラクトースオペロンプロモーターの誘導によりβ-ガラクトシダーゼとの融合タンパク質等として容易に発現が確認される。

この様にして、cDNAが組み込まれたλgt11ファージを富沢らの方法(「バクテリオファージの実験法」99頁~174頁、岩波書店1970年9月20日発行)により大腸菌に感染させ、IPTG等を含む培地で培養する。形成されたブランクを非A非B型肝炎特異モノクローナル抗体を使用し、免疫スクリーニング等の方法によって選択することにより容易に目的とするcDNAを得ることができる。

この免疫スクリーニング法に使用する抗体は特開昭61-176856号公報、或いは同61-56196号公報に記載されている方法に従い調

Obinaら、Cell(セル)、40, 747-755(1980)]によりこれらpoly A⁺ RNAに対するcDNAライブラリーを得る。例えば、4塩基程度の任意のプライマーを用い逆転写酵素により上記mRNAに対するcDNAをランダムに合成する。さらにこのcDNAをDNAメチラーゼ(例えばEcoRIメチラーゼ)によりメチル化し、cDNA中に存在する該制限酵素切断部位を保護した後、両端に該制限酵素切断部位入りDNAリンカー[例えばEcoRIリンカー(OGAATTGG)]を付加し、該制限酵素(例えばEcoRI)により消化を行う。

このものをプラスミドあるいはλファージ等のクローニングベクターにクローニングする。例えば発現クローニングベクターであるλgt11 DNA[Young, R. A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (プロシーディングナショナルアカデミーオブサイエンスUSA) 80, P. 1194-1198(1983)]のEcoRI部位に導入することができる。

特開昭64-2576(5)

製することができる。スクリーニング法もこれらに記載されているウエスタンブロッティング法で行えばよい。

更に上記免疫スクリーニング陽性のブラークから菌液らの方法によりファージを増殖させ、そのものから T. Maniatis らの方法 [Molecular Cloning (モレキュラー・クローニング), Cold Spring Harbor] [Laboratory 95 (1982)] により DNA を複製し適切な制限酵素例えば Not I 等で切断後、Maxam and Gilbert の方法 (Methods in Enzymology 65, 499-560 (1980)) によって又は制限酵素で切断後、更に M / J ファージにクローンし、Sanger らのジデオキシ法 (Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463 (1977)) によって目的 cDNA セグメントの塩基配列が決定できる。

この様にして非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする cDNA 断片が得られる。しかしながら、このようにして得られる DNA 断片は、通常非 A 非 B 型肝炎特異抗原をコードする遺伝子の部分

（ドリサーチ）, 2, 1513 (1979)] に従ってプラスミド DNA を得。適切な制限酵素で切断後、上記の Maxam and Gilbert の方法によって又は、制限酵素で切断後、更に M / J ファージもしくはプラスミド pVO 12 等にクローンし、上述の Sanger らのジデオキシ法によって目的の完全長 cDNA セグメント (4.4 kb) の塩基配列の決定を行う。

(実施例)

以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、その製法を越えない限り以下の実施例によって限定されるものではない。

実施例 1 非 A 非 B 型肝炎感染チンパンジー肝臓よりのポリ(A) RNA の調製

肝臓よりチオシアン酸グアニジン塩化リチウム法 [カサラ (Cathala) ら、ディーエヌエイ (DNA), 2, 329 (1983)] に従いポリ(A)を有する RNA を下記の如く調製した。

非 A 非 B 型肝炎に感染したチンパンジーより

cDNA 断片として得られる。完全長の cDNA は、上記と同様な方法で poly A⁺ - mRNA を単離、精製し、このものから岡山 - Berg のベクター・プライマーの方法 (Molecular and Cellular Biology 2, 161-170, 1982) により cDNA ライブラリーを得る。この様にして調製した cDNA 含有プラスミドを宿主、例えば D. Hansen の方法 (J. Mol. Biol. (ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー) 166, 557 (1983)) により大腸菌等に形質転換し、アンピシリン耐性株を取得する。この形質転換体を先の部分、DNA 断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法等によりスクリーニングする。

かかるプローブの作成法としては、ストレプトアビジン法、ホトビオチン核酸おび核酸を使用したニクトランスレーション法等が好ましい。

このようにして得られた cDNA クローンを含むコロニーを培養し Birnboim らの方法 [Nucleic Acid Res. (ニュークレイックアシ

感染肝臓を摘出し、直ちに液体窒素にて凍結した。このものを液体窒素とともにワーリングブレンダーに入れ 3,000 r.p.m. 3 分間にて粉砕した。このものを 5 M チオシアン酸グアニジン、10 mM EDTA、50 mM トリス-HCl (pH 7) および 5% (v/v) β -メルカプトエタノールからなる溶液 100 ml 中でテフロンホモゲナイザー (5 rpm) にてさらに破砕し、可溶化した。この可溶化物 30 ml を遠心管に入っている 5.7 M CsCl 溶液 10 ml 上に静かにのせ、

Hitachi RFB 2 型 - 3 ローターにて 27,000 rpm, 30 時間遠心後 RNA を沈殿として回収した。この RNA の沈殿を 0.1 M ラウリル硫酸ナトリウム、10 mM EDTA、10 mM トリス-HCl (pH 7.5) からなる溶液 10 ml に溶解しフェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収した。得られた RNA 約 3.95 mg を 10 mM トリス-HCl (pH 8.0) および 1 mM EDTA からなる溶液 1 ml に溶かし、5℃、5 分間インキュベートし 0.1 ml の 5 M NaOH

特開昭64-2576(6)

を加えた。混合物をオリゴ[dT]セルロース・カラム〔ビー・エル・バイオケミカル(P-L Biochemical)社製〕クロマトグラフィー(カラム体積0.5 ml)にかけた。吸着したポリ(A)を有するmRNAを10 mM トリス-HCl (pH 7.5) および1 mM EDTA からなる溶液で溶出し、ポリ(A)を有するmRNA 約100 μg を得た。

まずポリ(A) mRNA 10 μg をRT緩衝液(20 mM トリス-HCl (pH 8.8), 0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂) 50 μL に溶かし、ランダムプライマー d(M)₆〔ビー・エル・バイオケミカル(P-L Biochemical)社製〕8 μg を加え、95℃、3分間加熱し、変性させた。これを室温まで徐冷し、ランダムプライマーをアニールさせた。このものに10 mM dNTP 10 μL、逆転写酵素225 u(宝酒造社製)を加え、水を加えて計100 μLの系とし、42℃で1時間反応させた。

上記反応液50 μL を使用し10 mM NAD

2 μL, 10 mM dNTP 10 μL, RNase H 5 u、大腸菌リガーゼ1 u、大腸菌DNAポリメラーゼ16.3 u、10倍濃度のT₄ DNAリガーゼ緩衝液(0.1 M トリス-HCl (pH 7.5), 0.1 M DTT, 60 mM MgCl₂) 10 μLを加え、計100 μLの系とし、37℃、1時間反応させ、二本鎖DNAを合成した。

上記の様にして得た二本鎖DNAを同様の水飽和フェノールで抽出し、エーテルで水層のフェノールを除いた後、エタノール沈殿を行った。

得られた沈殿を50 μLの水に溶かし、10倍濃度のT₄ DNAポリメラーゼ緩衝液(0.33 M トリス酢酸(pH 7.9), 0.66 M 酢酸カリウム, 0.1 M 酢酸マグネシウム, 5 mM DTT) 10 μL, 10 mM dNTP 10 μL, T₄ DNAポリメラーゼ6 uを加え、100 μLの系とし、37℃/1時間反応させ、二本鎖の平滑末端をもったDNAを得た。このものを上記したとおり、フェノール抽出し、除タンパクした後、エタノール沈殿を行ってDNAを精製し、風乾した。

このものに50 mM トリス-HCl (pH 7.5) 1 mM Na₂ EDTA, 5 mM DTT 20 μL, 100 u M₈-アデノシル-L-メチオニン2 μL, 1.8 μg/μL Eco RIメチラーゼ0.2 μLを加え、37℃/5分間反応させ、DNA断片上のEco RI制限酵素切断部位のメチル化を行ないその後70℃、15分熱処理を行って酵素を失活させた。

次に、3'リン酸化したEco RI リンカー(5'-GGAATTGC)を全合成DNA分子数の100倍になる様に加え、10倍濃度のT₄ DNAリガーゼ緩衝液(0.5 M トリス-HCl (pH 7.5), 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT)を5 μL加え、0.1 M ATP 5 μL, T₄ DNAリガーゼ5 uを加え計50 μLの系とし、4℃/6時間反応させた後、70℃、10分間加熱して酵素を失活させた。次に10倍濃度のEco RI緩衝液(1.5 M トリス-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 60 mM MgCl₂)を10 μL, Eco RI 100 uを加えて計100 μLの系とし37℃、2時

間反応させ、余分なリンカーを切除した。さらにBio Gel A-50 (0.2 cm × 3.3 cm) (Bio RAD社製)にこの反応液を通し、10 mM トリス-HCl (pH 7.5) 6 mM MgCl₂ 緩衝液にて流出し、余分なEco RIリンカーを除去し、Eco RIリンカーの付いた二本鎖cDNAを精製した。

得られたEco RI リンカー付二本鎖cDNA断片を用い、Eco RIで切断したλgt11 DNA 10 μg と10倍濃度のT₄ DNAリガーゼ緩衝液(前述) 10 μL, 0.1 M ATP 10 μL, T₄ DNAリガーゼ10 uを加え計100 μLの反応系で4℃/6時間反応させλgt11 DNAに上記二本鎖cDNA断片を挿入した。

λファージパッケージングキット(プロメガ Biotech社製)を用い上記DNAをλファージ粒子中へ導入した。パッケージングの手順はキットの説明書に従い行った。

このDNAパッケージングを終了したλgt11ファージを常法(バクテリオファージ実験法

特開昭64-2576(7)

99頁～174頁、岩波書店/1970年5月30日発行)、菅沢らの法により、大腸菌Y/1090株に感染させブランクを形成させた。約20万個のブランクより以下に示すような免疫スクリーニング法により陽性のクローン1個を得た。この免疫スクリーニングに使用した抗体は特開昭61-176856号公報に記載されている方法で調製したものである。

まずIgG/1に感染したY/1090 [YOUNG R.A.ら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (ブローニング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスUSA), 80, 1194-1198 (1983)] を4℃にて保菌した上清軟寒天とともにシャーレに置き、4℃にて5時間放置した。次に10mM IPTGを含んだニトロセルロースフィルター(日本社製BA-83ポアサイズ0.2μm)をその上に置き37℃にて3～4時間培養した。このニトロセルロースフィルターをTB8緩衝液(10mM トリス-HCl (pH 7.5) 50mM NaCl)で軽く洗い、3%

のTB8緩衝液に浸して行った。発色終了後、フィルターは水でよく洗い水を入れたビニール袋に入れて冷蔵所に保存した。

このようにしてポジティブなブランクを1個得た。このポジティブブランクのシングルブランクアイソレーションを3度行った。3度とも免疫スクリーニングを同様に行いポジティブであることを確認した。

次にこのファージを大量に培養し、そのDNAを精製した。まずY/1090菌をNZ培地(NZアミン10g、NaOH 5g、5mM MgCl₂を水1Lに加え、pH 7.2に調整)10mlで一晩培養した。このもの1mlにm.o.i (マルチプリシティ オブ インフュクション) 0.1になる様にファージを感染させ、37℃/10分間放置後、NZ培地1Lに移し菌が溶解するまで7～8時間37℃にて揺とう培養を行いクロロホルム5mlを加え、さらに30分間揺とうを続けた。次に菌体残骸を6500 r.p.m./10分間の遠心分離により除去し、上清にNaOH 2g、ポリエ

セラチンを含むTB8緩衝液400mlに浸し、40℃/1時間揺とうを行ってニトロセルロースフィルターのプロッキングを行った。次に非A非B型肝炎特異抗体に対するモノクローナル抗体(OD₄₅₀=4.3)を1%セラチンを含むTB8緩衝液に400分の1希釈になるように加え、フィルター1枚につき2mlになる様にビニール袋にフィルターとともに入れ、室温で1時間反応させた。次に0.05% Tween 20を含むTB8緩衝液400mlにて10分間3回洗浄し検体2次抗体である抗マウスIgG-PAP(ファースラディシムペルオキシダーゼ)(バイオ・ラッド社製)を1%セラチンを含むTB8緩衝液に1000分の1希釈に加え、フィルター1枚につき2mlになる様にビニール袋にフィルターとともに入れ、室温で2時間反応させ、同様に0.05% Tween 20を含むTB8緩衝液400mlにて10分間3回洗浄した。発色はフィルターを4-chloro-1-naphthol (バイオ・ラッド社製)1.2mgを過酸化水素水を含む20ml

テレングリコール70gを加えよく溶かしてから4℃で一晩放置した。6500 r.p.m./20分の遠心分離で沈殿を集め、よく水滴を切り沈殿を20mlのTM緩衝液(10mM トリス-HCl (pH 7.5)、5mM MgCl₂)に溶かしDNase I、RNase Aをともに10μg/mlの濃度になる様に加え、37℃/1時間反応させた。

次に、20mlのクロロホルムを加えて攪拌し、ポリエテレングリコールをクロロホルムに溶解させて水層からとり除去した。この水層をさらに28000 r.p.m./60分の超遠心分離にかけファージ粒子のペレットを得た。このペレットを1mlのTM緩衝液にとかし、0.5% 密度勾配液(33000 r.p.m./20時間)により1.45～1.50のファージ粒子を含んだ分画を得た。TM緩衝液に対し一晩、透析を行った後、プロテインアーゼKを100μg/mlになる様に加え、37℃で1時間反応させた。その後、同量の水和フェノールを加えゆるやかにフェノール抽出を行った。6500 r.p.m./10分間の遠

特開昭64-2576(8)

心分離の後、水層をとり出し、透析チューブに入れて水に対して4℃で一晩透析を行った。この際にして、約500のDNAが得られた。

このDNA 100μgをEco RI 100uで前述の緩衝液系100μL中に37℃反応して切断したところ370bpと345bpのcDNAセグメントがフージDNAに挿入されていることが判明した。この2つのEco RI フラグメントをクローニングベクターであるpUC 119のEco RI 部位に再度クローニングし、ジデオキシ法にて市販のプライマー CAGGAAACAGCTATG AG および AGTCAGGACGTTGTA を用いて夫々についてその塩基配列を決定した。2つのDNAの結合部分の塩基配列はこのcDNA断片の内部にあるBam HI、Eco RV 部位を同部位に特異的な制限酵素で切断し、得られるBam HI - Eco RV DNA フラグメントをpUC 119のBam HI、Bam I 部位に挿入して同様にジデオキシ法にてそのフラグメントの塩基配列を決定した。該cDNA断片は、図-1に示す通りの塩基配列

収した。Kpn I 切断した該DNA 約200μgを40mM カコジル酸ナトリウム、30mM トリス-HCl (pH 6.8)、1mM NaCl、および0.1mM ジチオスレイトール(以下DTTと略記する)からなる緩衝液(以下TdT緩衝液と略記する)にdTTPを0.25mMとなるように加えた溶液200μLに加え、さらに8/μのターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(以下TdTと略記する)(P-L Biochemicals 社製)を加えて37℃、11分間反応させた。ここでpODV 1のKpn I 切断部位の3'末端ポリ(dT)鎖が約67個付加された。該溶液からフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿によりポリ(dT)鎖の付加したpODV 1 DNA 約100μgを回収した。該DNAを10mM トリス-HCl (pH 7.5)、6mM MgCl₂、および100mM NaClからなる緩衝液150μLに加え、さらに360uのHpa Iを加え、37℃2時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動かけ、約3.1KpのD

を有する。これは非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする遺伝子の部分cDNA断片であった。

実施例2 完全長の遺伝子を持ったcDNAの取得

実施例1記載のとおりにしてmRNAを調製し、岡山ベクターにより常法(Molecular cloning, PP 211, 1982)に従いcDNAを合成する。以下にcDNAの合成法を記す。

pODV 1 [オカヤマ・アンド・バーグ(Okayama & Berg): モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジイ(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 400μgを10mM トリス-HCl (pH 7.5)、6mM MgCl₂、および10mM NaClからなる溶液300μLに加え、さらに500uのKpn I (宝酒造社製、以下略記しない限り制限酵素はすべて宝酒造社製)を加えて、37℃で6時間反応させ、プラスミド中のKpn I 部位で切断した。フェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿によりDNAを回

N A断片を分離、回収し、約60μgのポリ(dT)鎖付加pODV 1を得た。該DNAを10mM トリス-HCl (pH 8.0)および1mM EDTAからなる溶液500μLに溶解し65℃5分間インキュベート後、氷冷して50μLの5M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dA)セルロースカラム(コラポラティブリサーチ社製)クロマトグラフィにかけた。ポリ(dT)鎖長が充分なものはカラムに吸着し、これを10mM トリス-HCl (pH 8.0)および1mM EDTAからなる溶液で溶出し、ポリ(dT)鎖の付加したpODV 1 (以下ベクタープライマーと略記する)37μgを得た。

次にリンカーDNAの調製を行った。pL 1 [オカヤマ・アンド・バーグ(Okayama & Berg), モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジイ(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 約1μgを10mM トリス-HCl (pH 7.5)、6mM MgCl₂、および50mM NaClからなる溶液300μLに加えさらに50uのPst Iを加え、

特開昭64-2576(9)

37℃で4時間反応させ、pL/DNA中のPst I部位で切断した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行い、Pst Iで切断したpL/DNA約13μgを回収した。該DNA約13μgをTdT緩衝液には終濃度0.25mMのdGTPを含む溶液50μLに加え、さらにTdT(P-L Biochemicals社製)54単位を加えて37℃/3時間インキュベートし、pLのPst I切断部位3'末端に(dG)鎖を約14個付加した。フェノール-クロロホルム抽出後エタノール沈殿にてDNAを回収した。該DNAを10mMトリス-HCl(pH 7.5)、6mM MgCl₂および40mM NaClからなる緩衝液100μLに加え、さらに80UのHind IIIを加えて37℃3時間インキュベートし、pL/DNAのHind III部位で切断した。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.5KbのDNA断片をDNA印ベーパー法【ドレッゼン(Dretzen)ら、アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、112, 295

末端に12個の(dG)鎖を付加した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出し、エタノール沈殿により(dG)鎖の付加したcDNA-ベクタープライマーDNAを回収した。該DNAを10mMトリス-HCl(pH 7.5)、6mM MgCl₂および40mM NaClからなる液400μLに溶かし、20UのHind IIIを加え、37℃3時間インキュベートし、Hind III部位で切断した。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿して0.5 pmoleの(dG)鎖付加cDNA-ベクタープライマーDNAを得た。該DNA 0.08 pmoleと前記のリンカーDNA 0.16 pmoleを10mMトリス-HCl(pH 7.5)、0.1M NaClおよび1mM EDTAからなる溶液40μLに溶かし、65℃、42℃、0℃でそれぞれ10分、25分、30時間インキュベートした。20mMトリス-HCl(pH 7.5)4mM MgCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、0.1M KClおよび0.1mM β-NADの組成で全量400μLとなるよう反応液を調製した。

(1981)にて回収し、オリゴ(dG)鎖付きのリンカーDNA(以下単にリンカーDNAと略記する)を得た。

上記で調製したポリ(A)RNA約2μg、ベクタープライマー約1.4μgを50mMトリス-HCl(pH 8.3)、8mM MgCl₂、30mM KCl、0.3mM DTT、2mM dNTP(dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP)および10Uのリボヌクレアーゼインヒビター(P-L Biochemicals社製)からなる溶液22.3μLに溶解し、10Uの逆転写酵素(生化学工業社製)を加え、37℃で40時間インキュベートし、mRNAに相補的なDNAを合成させた。該DNAをフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行いRNA-DNA二重鎖の付加したベクタープライマーDNAを回収した。該DNAを40μM dCTPおよび0.2μgポリ(A)を含むTdT緩衝液20μLに溶かし、14UのTdT(P-L Biochemical社製)を加えて37℃で8時間インキュベートし、cDNA3'

該反応液に10Uの大腸菌DNAリガーゼ(New England Biolabs社製)を加え、11℃一夜インキュベートした。該反応液を各40μMのdNTP、0.15mM β-NADとなるよう同成分を追加調製し、5Uの大腸菌DNAリガーゼ、7Uの大腸菌DNAポリメラーゼI(P-L Biochemicals社製)および2Uの大腸菌リボヌクレアーゼH(P-L Biochemicals社製)を加え、12℃、25℃で順次1時間ずつインキュベートした。

上記反応でcDNAを含む組換えDNAの環状化とRNA-DNA二重鎖のRNA部分がDNAに置換され、完全な二重鎖DNAの組換えプラスミドが生成した。

このものを使用し、常法により作成した大腸菌MOJ04株のコンピテント細胞を形質転換した。形質転換体約5万個をニトロセルロース上に固定した。これらのコロニーをコロニーハイブリダイゼーション法[Molecular Cloning Cold Spring Harbor laboratory PP 329

特開昭64-2576(10)

(1982)により、常法に従い実施例1で得たcDNA断片を³²P標識してプローブとして用い、スクリーニングした結果、 ϕ 3Cで強く会合した3個の陽性をクローンが得られた。

これらのクローンをサザン(Southern)の方法(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J.Mol.Biol.)98,503(1975))により詳しく解析した結果、図3に示す非A非B型肝炎特異抗原蛋白質コードする遺伝子の完全長のcDNAが得られた。

(発明の効果)

大腸菌、枯草菌、酵母、哺乳動物細胞等の公知の宿主中、プロモータを含有する公知の発現制御配列の制御下本発明の非A非B型肝炎特異抗原性蛋白質をコードする遺伝子を発現させ、非A非B型肝炎特異抗原を大量に得ることができ、同抗原から得られる抗体は、免疫反応による同抗体の検出に応用される。

また、本発明の非A非B型肝炎ウイルス抗原性蛋白質をコードする遺伝子は、核酸ハイブリ

ダイゼーションによる同抗原性蛋白質遺伝子の検出のためのプローブとして有用である。

図面の簡単な説明

図-1は、実施例1で得たcDNAの塩基配列を表わす。

図-2は、実施例3で得たcDNAの塩基配列を表わす。

図中、第57番から第178番までが非A非B型肝炎特異抗原蛋白質をコードする塩基部分を表わす。

出願人 三菱化成工業株式会社

代理人 弁理士 長谷川 一

ほか1名

図-1(その1)

CTA GGA	CTA TAT	ACA CCA	GAA ACA	CTG TTT	TGT TGT	GAC GTT	GCA AAA	TAT AAC	TCC CCA
Leu Gly	Leu Tyr	Thr Pro	Glu Thr	Leu Phe	Cys Cys	Asp Val	Ala Lys	Tyr Asn	Ser Pro
ACT AAT	TTC CAG	ATA GAT	GGA AGA	AAT AGA	AAA GTG	ATT ATG	GAC TTA	AAG ACA	ATG GAA
Thr Asn	Phe Gln	Ile Asp	Gly Arg	Asn Arg	Lys Val	Ile Met	Asp Leu	Lys Thr	Met Glu
AAT CTT	GGA CTT	GCT CAA	AAT TGT	ACT ATC	TCT ATT	CAG GAT	TAT GAA	GTT TTT	CGA TGC
Asn Leu	Gly Leu	Ala Gln	Asn Cys	Thr Ile	Ser Ile	Gln Asp	Tyr Glu	Val Phe	Arg Cys
GAA GAT	TCA CTG	GAC GAA	AGA AAG	ATA AAA	GGG GTC	ATT GAG	CTC AGG	AAG AGC	TTA CTG
Glu Asp	Ser Leu	Asp Glu	Arg Lys	Ile Lys	Gly Val	Ile Glu	Leu Arg	Lys Ser	Leu Leu
TCT GCC	TTG AGA	ACT TAT	GAA CCA	TAT GGA	TCC CTG	GTT CAA	CAA ATA	CGA ATT	CTG CTG
Ser Ala	Leu Arg	Thr Tyr	Glu Pro	Tyr Gly	Ser Leu	Val Gln	Gln Ile	Arg Ile	Leu Leu
CTG GGT	CCA ATT	GGA GCT	GGG AAG	TCT AGC	TTT TTC	AAC TCA	GTG AGG	TCT GTT	TTC CAA
Leu Gly	Pro Ile	Gly Ala	Gly Lys	Ser Ser	Phe Phe	Asn Ser	Val Arg	Ser Val	Phe Gln
GGG CAT	GTA ACG	CAT CAG	GCT TTG	GTG GGC	ACT AAT	ACA ACT	GGG ATA	TCT GAG	AAG TAT
Gly His	Val Thr	His Gln	Ala Leu	Val Gly	Thr Asn	Thr Thr	Gly Ile	Ser Glu	Lys Tyr

- 特開昭64-2576(11)

図-1(その2)

670	680	690	700	710	720
AGG ACA TAC TCT ATT AGA GAC GGG AAA GAT GGC AAA TAC CTG CCA TTT ATT CTG TGT GAC					
Arg Thr Tyr Ser Ile Arg Asp Gly Lys Asp Gly Lys Tyr Leu Pro Phe Ile Leu Cys Asp					
730	740	750	760	770	780
TCA CTG GGG CTG AGT GAG AAA GAA GGC GGC CTG TGC ATG GAT GAC ATA TCC TAC ATC TTG					
Ser Leu Gly Leu Ser Glu Lys Glu Gly Gly Leu Cys Met Asp Asp Ile Ser Tyr Ile Leu					
790	800	810	820	830	840
AAC GGT AAC ATT CGT GAT AGA TAC CAG TTT AAT CCC ATG GAA TCA ATC AAA TTA AAT CAT					
Asn Gly Asn Ile Arg Asp Arg Tyr Gln Phe Asn Pro Met Glu Ser Ile Lys Leu Asn His					
850	860	870	880	890	900
CAT GAC TAC ATT GAT TCC CCA TCG CTG AAG GAC AGA ATT CAT TGT GTG GCA TTT GTA TTT					
His Asp Tyr Ile Asp Ser Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile His Cys Val Ala Phe Val Phe					
910	920	930	940	950	960
GAT GCC AGC TCT ATT GAA TAC TTC TCC TCT CAG ATG ATA GTA AAG ATC AAA AGA ATT CGA					
Asp Ala Ser Ser Ile Glu Tyr Phe Ser Ser Gln Met Ile Val Lys Ile Lys Arg Ile Arg					
970	980	990	1000	1010	1020
AGG GAG TTG GTA AAC GCT GGT GTG GTA CAT GTG GCT TTG CTC ACT CAT GTG GAT AGC ATG					
Arg Glu Leu Val Asn Ala Gly Val Val His Val Ala Leu Leu Thr His Val Asp Ser Met					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GAT CTG ATT ACA AAA GGT GAC CTT ATA GAA ATA GAG AGA TGT GTG CCT GTG AGG TCC AAG					
Asp Leu Ile Thr Lys Gly Asp Leu Ile Glu Ile Glu Arg Cys Val Pro Val Arg Ser Lys					

図-1(その3)

1090	1100	1110	1120	1130	1140
CTA GAG GAA GTC CAA AGA AAA CTT GGA TTT GCT CTT TCT GAC ATC TCG GTG GTT AGC AAT					
Leu Glu Glu Val Gln Arg Lys Leu Gly Phe Ala Leu Ser Asp Ile Ser Val Val Ser Asn					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
TAT TCC TCT GAG TGG GAG CTG GAC CCT GTA AAG GAT GTT CTA ATT CTT TCT GCT CTG AGA					
Tyr Ser Ser Glu Trp Glu Leu Asp Pro Val Lys Asp Val Leu Ile Leu Ser Ala Leu Arg					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CGA ATG CTA TGG GCT GCA GAT GAC TTC TTA GAG GAT TTG CCT TTT GAG CAA ATA GGG AAT					
Arg Met Leu Trp Ala Ala Asp Asp Phe Leu Glu Asp Leu Pro Phe Glu Gln Ile Gly Asn					
1270	1280	1290	1300		
CTA AGG GAG GAA ATT ATC AAC TGT GCA CAA GGA AAA AAA TAG					
Leu Arg Glu Glu Ile Ile Asn Cys Ala Gln Gly Lys Lys ***					

特開昭64-2576 (12)

図-2 (その1)

5' GGGGGGCTAC CCTCAGCTCT AGCTCATACT ACAGACAGTA CAACAGATCA AGAAGTATGG CAGTGACAAC TCGTTTGACA
3' CCCCCCGATG GGAGTCGAGA TCGAGTATGA TGTCTGTCTAT GTTGTCTAGT TCTTCATACC GTCAGTGTG AGCAAACGT
90 TGGTTGCATG AAAAGATCCT GCAAAATCAT TTTGGAGGGA AGCGGCTTAG CCTTCTCTAT AAGGGTAGTG TCCATGGATT
ACCAACGTAC TTTTCTAGGA CGTTTTAGTA AAACCTCCCT TCGCCGAATC GGAAGAGATA TTCCCATCAC AGGTACCTAA
170 CCATAATGGA GTTTTGCTTG ACAGATGTTG TAATCAAGGG CCTACTCTAA CAGTGATTGA TAGTGAAGAT CATATTATTG
GGTATTACCT CAAAACGAAC TGTCTACAAC ATTAGTTCCC GGATGAGATT GTCATAAAT ATCACTTCTA GTATAATAAC
250 GAGCATATGC AGAAGAGGGT TACCAGGAAA GAAAGTATGC TTCCATCATC CTTTTTGAC TCAAGAGAC TAAATTTCA
CTCGTATACG TCTTCTCCCA ATGGTCTTT CTTCATACG AAGGTAGTAG GAAAAACGTG AAGTTCTCTG ATTTTAAAGT
330 GAATGGAAAC TAGGACTATA TACACCAGAA ACACGTGTTT GTTGTGACGT TGCAAAATAT AACTCCCCAA CTAATTTCCA
CTTACCTTTG ATCCTGATAT ATGTGGTCTT TGTGACAAAA CAACACTGCA ACGTTTTATA TTGAGGGGTT GATTAAAGGT
410 GATAGATGGA AGAAATAGAA AAGTGATTAT GGACTTAAAG ACAATGGAAA ATCTTGGACT TGCTCAAAAT TGTACTATCT
CTATCTACCT TCTTTATCTT TTCACTAATA CCTGAATTTT TGTACCTTT TAGAACCTGA ACGAGTTTGA ACATGATAGA
490 CTATTCAGGA TTATGAAGTT TTTGATGCG AAGATTCACT GGACGAAAGA AAGATAAAAG GGGTCATTGA GCTCAGGAAG
GATAAGTCCT AATACTTCAA AAAGCTACGC TTCTAAGTGA CCTGCTTTCT TTCTATTTTC CCCAGTAACT CGAGTCCTTC
570 AGCTTACTGT CTGCCTTGAG AACTTATGAA CCATATGGAT CCCTGGTTCA ACAAATACGA ATTCTGCTGC TGGGTCCAAT
TCGAATGACA GACGGAACCTC TTGAATACTT GGTATACCTA GGGACCAAGT TGTTTATGCT TAAGACGACG ACCCAGGTTA

図-2 (その2)

650 TGGAGCTGGG AAGTCTAGCT TTTTCAACTC AGTGAGGTCT GTTTTCCAAG GGCATGTAAC GCATCAGGCT TTGGTGGGCA
ACCTCGACCC TTCAGATCGA AAAAGTTGAG TCACTCCAGA CAAAAGGTTT CCGTACATTG CGTAGTCCGA AACCACCCGT
730 CTAATACAAC TGGGATATCT GAGAAGTATA GGACATACTC TATTAGAGAC GGGAAAGATG GCAAATACCT GCCATTTATT
GATTATGTTG ACCCTATAGA CTCTTCATAT CCTGTATGAG ATAATCTCTG CCCTTTCTAC CGTTTATGGA CGGTAAATAA
810 CTGTGTGACT CACTGGGGCT GAGTGAGAAA GAAGGGGGCC TGTGCATGGA TGACATATCC TACATCTTGA ACGGTAACAT
GACACACTGA GTGACCCCGA CTCACCTTTT CTTCGCGCGG ACACGTACCT ACTGTATAGG ATGTAGAACT TGCCATTGTA
890 TCGTGATAGA TACCAGTTTA ATCCCATGGA ATCAATCAAA TTAAATCATC ATGACTACAT TGATTCCCCA TCGCTGAAGG
AGCACTATCT ATGGTCAAAT TAGGGTACCT TAGTTAGTTT AATTTAGTAG TACTGATGTA ACTAAGGGGT AGCGACTTCC
970 ACAGAATTCA TTGTGTGGCA TTTGTATTTG ATGCCAGCTC TATTGAATAC TTCTCCTCTC AGATGATAGT AAAGATCAAA
TGTCTTAAGT AACACACCGT AAACATAAAC TACGGTCGAG ATAACCTATG AAGAGGAGAG TCTACTATCA TTTCTAGTTT
1050 AGAATTCGAA GGGAGTTGGT AAACGCTGGT GTGGTACATG TGGCTTTGCT CACTCATGTG GATAGCATGG ATCTGATTAC
TCTTAAGCTT CCTCAACCA TTTGCGACCA CACCATGTAC ACCGAAACGA GTGAGTACAC CTATCGTACC TAGACTAATG
1130 AAAAGGTGAC CTTATAGAAA TAGAGAGATG TGTGCCTGTG AGGTCCAAGC TAGAGGAAGT CCAAAGAAAA CTTGGATTTG
TTTTCCACTG GAATATCTTT ATCTCTCTAC ACACGGACAC TCCAGGTTCC ATCTCCTTCA GGTTCCTTTT GAACCTAAAC
1210 CTCTTTCTGA CATCTCGGTG GTTAGCAATT ATTCCTCTGA GTGGGAGCTG GACCCTGTAA AGGATGTTCT AATTCTTTCT
GAGAAAGACT GTAGAGCCAC CAATCGTTAA TAAGGAGACT CACCCTCGAC CTGGGACATT TCCTACAAGA TTAAGAAAGA

特開昭64-2576(13)

図-2(その3)

1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360
GCTCTGAGAC	GAATGCTATG	GGCTGCAGAT	GACTTCTTAG	AGGATTTGCC	TTTTGAGCAA	ATAGGGAATC	TAAGGGAGGA
CGAGACTCTG	CTTACGATAC	CCGACGTCTA	CTGAAGAATC	TCCTAAACGG	AAAACCTCGT	TATCCCTTAG	ATCCCTCCT
1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
AATTATCAAC	TGTGCACAAG	GAAAAAATA	GATATGTGAA	AGGTTACAGT	AAATTTCTCT	ACATCACAGA	AGATTAAAAT
TTAATAGTTG	ACACGTGTTT	CTTTTTTTAT	CTATACACTT	TCCAAGTGCA	TTTAAAGGAG	TGTAGTGTCT	TCTAATTTTA
1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520
TCAGAAAGGA	GAAAAACACAG	ACCAAAGAGA	AGTAACTAAG	ACCAAAGGGA	TGTGTTTTAT	TAATGTCTAG	GATGAAGAAA
AGTCTTTCCT	CTTTTGTGTC	TGGTTTCTCT	TCATTGATTG	TGGTTTCCCT	ACACAAAATA	ATTACAGATC	CTACTTCTTT
1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
TGCATAGAAC	ATTGTAGTAC	TTGTAAATAA	CTAGAAATAA	CATGATTTAG	TCATAATTGT	GAAAAATAAT	AATAATTTTT
ACGTATCTTG	TAAACATCATG	AACATTTATT	GATCTTTATT	GTAATAAATC	AGTATTAACA	CTTTTTATTA	TTATTAAAAA
1610	1620	1630	1640	1650	1660		
CTTGGAATTA	TGTTCTGTAT	CTGTGAAAAA	ATAAATTTCT	TATAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAA 3'	
GAACCTAAAT	ACAAGACATA	GACACTTTTT	TATTTAAAGA	ATATTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTT 5'	

第1頁の続き

⑦発明者	紅林	理恵	神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
			会社総合研究所内
⑧発明者	寺西	豊	神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式
			会社総合研究所内
⑨発明者	中西	重忠	京都府京都市左京区岩倉長谷町517-116
⑩発明者	喜多村	直美	京都府京都市左京区高野上竹屋町31